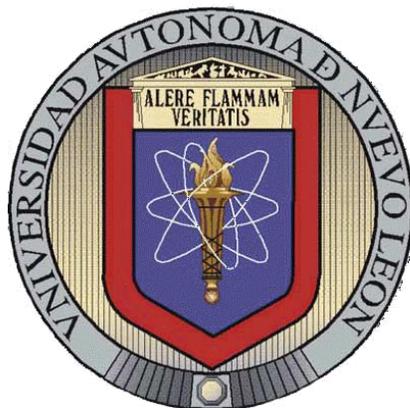


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN *p23* DE AISLAMIENTOS DEL VIRUS TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV), DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO

Por

IBT. JOSÉ LUIS SALVADOR NÚÑEZ SÁNCHEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con acentuación en Microbiología.

Noviembre 2012

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN P23 DE AISLAMIENTOS DEL
VIRUS TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV), DEL ESTADO DE NUEVO
LEÓN, MÉXICO**

Comité de tesis:

Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas

Presidente

Dr. Mario Alberto Rocha Peña

Secretario

Dra. Patricia Tamez Guerra

Vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A mis asesores, Dra. María Magdalena Iracheta y al Dr. Mario Alberto Rocha, por haberme dado la oportunidad de trabajar en este proyecto, el tiempo invertido en la revisión y corrección del trabajo, y por todo lo que me enseñaron durante mi maestría.

Al Dr. Alberto Gómez Treviño por su ayuda en la parte experimental y teórica del trabajo, y enseñarme que al ser perseverantes y hacer las cosas con calma se obtienen mejores resultados.

Al Dr. Juan Francisco Contreras, Dra. Katiushka Arévalo y a la Dra. Patricia Tamez por su ayuda en la revisión del trabajo.

A mis padres José Núñez y Cecilia Sánchez por enseñarme a no darme por vencido nunca, ofrecerme su apoyo incondicional aún desde tan lejos, y ser los mejores padres del mundo.

A mis hermanos Juan y Carlos por estar pendientes de mi trabajo en todo momento y darme ánimos en los momentos difíciles.

A mis tíos Dra. Claudia y Dr. Magdaleno, y primos; Marco y Emiliano, por apoyarme en todo momento durante mi maestría, sin su ayuda y consejos no hubiera podido concluir mis estudios.

A mis amigos Raúl, Dante, Natalia, Gauri, Alejandra, Carlitos, Sarah, Cindy, Cynthia y Aralia por su amistad y los buenos momentos que pasamos.

A mis compañeros de laboratorio, Samuel, Salvador y Margarita por su amistad y consejos de laboratorio. Y a todas las personas que no mencioné y que formaron parte de mi vida durante mi estancia en Monterrey. Muchísimas gracias a todos.

Dedicatoria

A mis abuelos

José Salvador Núñez y María del Carmen Pelatos

Luis Javier Gaspar Sánchez y Gloria Marmolejo

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
TABLA DE CONTENIDO	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
NOMENCLATURA	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
1. La industria cítrica	3
2. Características generales del virus tristeza de los cítricos	5
3. Gen <i>p23</i> del virus tristeza de los cítricos	6
4. Métodos de discriminación de aislamientos	8
4.1 Polimorfismo de conformación de cadena simple	9
4.2 Métodos basados en PCR	10
4.3 Serología	11
HIPÓTESIS	13
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. Muestras de tejido de plantas de cítricos infectadas por el CTV	15
2. Extracción de ácidos nucleicos de RNA viral	16
3. Obtención de DNA complementario del gen <i>p23</i>	16
3.1 Diseño de iniciadores	16
3.2 Retro-transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa	17
3.3 Estandarización de condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa	17
4. Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP)	17

5. RT-PCR bi-direccional	18
RESULTADOS	20
1. Obtención de DNA complementario para el gen <i>p23</i>	20
2. Polimorfismo de conformación de cadena simple	21
3. RT-PCR bi-direccional	24
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	37
LITERATURA CITADA	38

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
Tabla 1. Aislamientos del virus tristeza de los cítricos del estado de Nuevo León, México y de los estados de Florida y California, Estados Unidos de Norteamérica.	15
Tabla 2. Secuencia de iniciadores empleados en las reacciones de transcripción reversa y PCR para la amplificación del gen <i>p23</i> del virus tristeza de los cítricos.	16
Tabla 3. Secuencia de iniciadores empleados en las reacciones de RT-PCR bi-direccional.	19
Tabla 4. Representación gráfica de los productos amplificados por RT-PCR bi-direccional para cada aislamiento, usando los iniciadores p231, p232, PM82, PM83 (severo y débil); e iniciadores p231, p232, PM82 y PM84 (severo y atípico).	28

LISTA DE FIGURAS

Figuras

- Figura 1. Representación esquemática del gen *p23* con el juego de iniciadores para la reacción de RT-PCR bi-direccional, p231, p232, PM82, PM83, PM84. 18
- Figura 2. Productos de amplificación en gel de agarosa 2% del gen *p23* de aislamientos del CTV usando los iniciadores p231 y p232. 21
- Figura 3. Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP). Electroforesis en gel de poliacrilamida 8%, de la reacción de PCR del gen *p23* de las 18 muestras tratadas. 23
- Figura 4. Dendrograma obtenido mediante el método UPGMA (*Unweighted pair-group method*) utilizando el coeficiente de Dice con el software Fingerprint II de Bio-rad. 24
- Figura 5. Productos de amplificación en gel de agarosa 2% de la RT-PCR bi-direccional del gen *p23* para las 18 muestras de CTV usando los iniciadores p231, p232, PM 82, y 83 (Reacción A) para distinguir entre cepas severas y débiles. 25
- Figura 6. Productos de amplificación en gel de agarosa 2% de la RT-PCR bi-direccional del gen *p23* para las 18 muestras de CTV usando los iniciadores p231, p232, PM 82 y 84 (Reacción B) para distinguir entre cepas severas y atípicas. 26

NOMENCLATURA

Símbolo o abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
CTV	Virus tristeza de los cítricos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
<i>et al</i>	Y otros (lat. <i>et alteri</i>)
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
RNA	Ácido Ribonucleico
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena simple
UV	Ultra Violeta

RESUMEN

El virus tristeza de los cítricos (CTV) es de distribución mundial y ocasiona la enfermedad viral de mayor importancia económica para el cultivo de los cítricos. El RNA genómico (RNAg) del CTV contiene 12 marcos de lectura que codifican por lo menos para 12 productos de expresión con diferentes funciones en el ensamblaje de partículas virales y multiplicación del RNAg. El gen *p23* ubicado en el extremo proximal 3' codifica una proteína de alrededor de 23kDa que se acumula en la fracción soluble del citoplasma en tejido de cítricos infectado por el CTV. Esta proteína denominada *p23*, tiene afinidad de adherencia al RNAg y se le han encontrado funciones de regulación del balance de cadenas positivas y negativas del RNAg durante la multiplicación, así como en el desarrollo de síntomas. Adicionalmente, se ha determinado una variabilidad en la secuencia nucleotídica del gen *p23* en diferentes aislamientos del CTV a nivel mundial, lo cual permite discriminar la severidad de aislamientos del CTV con base al análisis molecular del gen *p23*. El objetivo del presente estudio fue evaluar e implementar el uso de las técnicas moleculares SSCP (Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple) y retrotranscripción acoplada a la reacción de cadena de la polimerasa (RT-PCR) bi-direccional para el gen *p23* del virus tristeza de los cítricos con el fin de discriminar aislamientos del estado de Nuevo León, México. Se diseñaron iniciadores específicos para el gen *p23* del CTV y se estandarizaron las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), obteniendo el producto esperado de 630 pb para las 18 muestras analizadas. Se agruparon los aislamientos con base en los perfiles obtenidos por SSCP. Los aislamientos fueron clasificados mediante RT-PCR bi-direccional con los iniciadores PM82, PM83 y PM84. Los perfiles electroforéticos obtenidos mediante SSCP no permitieron la discriminación de aislamientos del estado de Nuevo León, pero fueron útiles para la detección de mezclas de poblaciones en los aislados. Por medio de la técnica de RT-PCR bi-direccional se lograron identificar secuencias características de cepas severas, débiles y atípicas en 17 de las 18 muestras analizadas. Los resultados obtenidos indican la presencia de aislamientos severos potencialmente peligrosos en el estado de Nuevo León, México.

INTRODUCCIÓN

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV) es uno de los patógenos de mayor importancia del cultivo de los cítricos, el cual ha causado pérdidas millonarias a la citricultura a nivel mundial. Las primeras epifitias de decaimiento en árboles de naranjo dulce injertados sobre patrón de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) ocurrieron en Argentina y Brasil en la década de 1930 destruyendo la citricultura de ambos países injertada mayormente en patrón de naranjo agrio (Wallace, 1978; Bar-Joseph *et al.*, 1989). En 1939 se produjo también una epifitia en Estados Unidos, específicamente en el estado de California (Wallace, 1978). En México, el CTV se reportó por primera vez en un lote de variedades en Tamaulipas, a principios de la década de 1980 (González Garza, 1983). Sin embargo, no fue motivo de atención sino a partir de 1992, en que se detectaron plantas infectadas en viveros comerciales en el Estado de Veracruz (Rocha-Peña, Silva Vara, 1994).

En la actualidad existen más de 500 mil hectáreas de cítricos en las diferentes zonas agroecológicas de México, las cuales se consideran vulnerables al CTV, por estar mayormente injertadas en patrón de naranjo agrio, por lo que el gobierno federal estableció, desde 1993, la Campaña Nacional Fitosanitaria del CTV, con el objetivo de detectar plantas infectadas por el virus y su eliminación de las plantaciones. La conducción de la Campaña del CTV se rige bajo la Norma Oficial Mexicana No. 031 (SAGARPA, 2001), y se llevaba a cabo a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) en coordinación con los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de cada estado citrícola (SAGARPA, 2007). Hasta el año 2006 el muestreo incluyó 59 mil 135 hectáreas de cítricos, en las cuales se detectaron 4 mil 468 árboles positivos para el CTV, de un total de casi un millón 500 mil muestras analizadas en 23 estados citrícolas del país, con excepción de Querétaro, Sinaloa y Chiapas (SAGARPA, 2007).

A partir del año 2007 se suspendió la ministración de recursos económicos para la aplicación de la campaña de monitoreo a nivel nacional, debido a la ausencia de síntomas de decaimiento por el CTV a nivel de campo, así como por la presunción, expresada en voz de oficiales de la DGSV, de que los aislamientos presentes del virus eran del tipo débil (Rocha-Peña, 2009). Los reportes de árboles positivos van en incremento a partir del año 2004 y para el 2007 se reportaron un total de 6843 árboles positivos, con lo que acumulan hasta ese año cerca de 13 mil árboles infectados (SAGARPA 2011).

En México se ha detectado mediante técnicas moleculares, la presencia potencial de aislamientos del tipo declinamiento. Entre los años 1996-1998 se llevó a cabo un estudio en el que se muestrearon tres huertas del estado de Nuevo León (Montemorelos, Hualihuenses y Linares). Se realizó la detección del CTV utilizando la prueba ELISA con anticuerpos policlonales anti-CTV y mediante el anticuerpo monoclonal MCA13 de reacción específica para aislamientos del tipo declinamiento. La reacción positiva al anticuerpo MCA13 en 35 de 52 árboles infectados con el CTV indicó la presencia de aislamientos del tipo declinamiento en el estado de Nuevo León (Silva vara *et al.*, 2001). Por otro lado, el análisis SSCP (polimorfismo de conformación de cadena simple) de aislamientos del CTV del estado de Veracruz y Tamaulipas, enfocados en los genes *p23* y *p25*, indicaron también la presencia de aislamientos del tipo severo en el estado de Tamaulipas (Loeza-Kuk *et al.*, 2005).

ANTECEDENTES

1. La industria citrícola

Los cítricos son una de las especies arbóreas más importantes que se cosechan en el mundo con una superficie de cultivo de más de 7 millones de hectáreas distribuidas en aproximadamente 100 países, principalmente en áreas tropicales y subtropicales, con una producción de aproximadamente 107 millones de toneladas por año, constituyendo así el cultivo frutal de mayor importancia en el mundo (FAO, 2005).

El virus tristeza de los cítricos es de distribución mundial y es considerado una de las mayores amenazas para la industria citrícola. El CTV se originó aparentemente en Asia donde existió por siglos sin ser reconocido, debido a que los cítricos comúnmente cultivados en esos lugares son aparentemente tolerantes (Mooney y Harty 1992). La enfermedad con mayor importancia antes de CTV era gomosis o pudrición del pie ocasionada por varias especies del hongo *Phytophthora*. Consecuentemente los árboles fueron injertados sobre naranjo agrio el cual era tolerante a *Phytophthora*. Esta decisión contribuyó al dramático efecto que ha tenido CTV en la producción mundial de cítricos (Mooney y Harty 1992).

El primer desastre por CTV fue reportado en 1930 en Argentina, donde el 90% de los cítricos estaban plantados sobre naranjo agrio. Un rápido decaimiento fue identificado por primera vez en Australia y Nueva Zelanda en 1940. Esto fue precedido por síntomas similares en Sudáfrica en 1900, Java en 1928, Argentina en 1930, Brasil en 1937 y EUA en 1939 (Mooney y Richardson 1992). Actualmente existen más de 500 mil hectáreas de cítricos en las diferentes zonas agroecológicas de México, las cuales se consideran vulnerables al CTV (SAGARPA, 2011).

En México el CTV aparentemente no ha ocasionado daños a la citricultura; sin embargo, la predominancia del portainjerto naranjo agrio en la mayoría de las plantaciones, así como las extensas áreas plantadas con lima mexicana {*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle} en la Costa del Pacífico, lo hacen totalmente vulnerable al CTV. El estado de Nuevo León, ubicado en el noroeste de México, tiene actualmente alrededor de 30,000 hectáreas de cítricos, plantadas principalmente con naranja tardía {*Citrus sinensis* (L.) Osb.}, y en menor proporción con naranjas tempranas y otras especies como toronja (*Citrus paradisi* Metacaf) y mandarina (*Citrus reticulata* Blanco); en ellas, el portainjerto predominante es el naranjo agrio (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 2009). Las heladas ocurridas en los años 1983 y 1989 dañaron las plantaciones, por lo que una gran cantidad de citricultores las rehabilitaron con material de propagación traído del estado de Veracruz, donde en 1992 y 1993 se encontraron focos de infección del CTV en viveros comerciales. Debido a lo anterior durante 1996-1998 se efectuó un muestreo para la detección del CTV en el estado de Nuevo León, encontrando 47 plantas positivas al CTV de un total de 7,030 árboles analizados. Las 47 plantas CTV positivas se encontraron en 3 huertas ubicadas en los municipios de Montemorelos (34 de 783), Hualahuises (1 de 4543) y Linares (12 de 1704) (Silva-Vara *et al.*, 2001), con un incremento en la ocurrencia de 0.27% y 0.18%, en las huertas de Montemorelos y Linares, respectivamente. Aún cuando se encontraron 35 aislamientos positivos al anticuerpo monoclonal MCA13, de los 47 encontrados, no se encontraron síntomas de declinamiento en campo (Silva-Vara *et al.*, 2001). Estudios similares realizados en el estado de Tamaulipas durante los años 2001-2002, mostraron un incremento en la incidencia del CTV mostrando una propagación relativa del virus en las huertas (Loeza-Kuk, 2003).

2. Características generales del CTV

El virus de la tristeza, es un miembro del género *Closterovirus*, de la familia *Closteroviridae* (Pappu *et al.*, 1997). Los viriones son partículas largas flexibles de 2000x11 nm de longitud. Su genoma está constituido por RNA de cadena simple y polaridad positiva de 19,226 a 19,296 bases con 12 marcos de lectura abiertos (ORFs) (Pappu *et al.*, 1997).

Existen diversos aislamientos de CTV que causan diferentes síntomas, la forma en que interactúan los aislamientos, los insectos vectores, las especies de cítricos y el ambiente es todavía desconocida y da complejidad al manejo de la enfermedad, así como a la detección de aislamientos severos (Stewart, 2006). Las propiedades biológicas del CTV en diversos hospedantes cítricos se han clasificado en: 1.- aislamientos asintomáticos; 2.- débiles induciendo solo aclaración de venas en lima mexicana; 3.- decaimiento y muerte plantas injertadas sobre naranjo agrio; 4.- picado de tallo en naranjo dulce; 6.- picado de tallo en toronja; y, 7. amarillamiento de plántulas en naranjo agrio (Rocha-Peña *et al.*, 1995). En estudios de caracterización molecular del genoma de diversos aislamientos del CTV se ha encontrado que la mitad 3' es relativamente conservada con 90% de identidad de secuencia, comparada con menos del 70% de identidad en el extremo 5' (Ayllón *et al.*, 2001).

Los marcos de lectura abiertos 1a y 1b, codifican proteínas relacionadas con la replicación, son traducidas del RNAg, mientras que los 10 marcos de lectura próximos 3', codifican para las proteínas p33, p6, p65, p61, p27, p25, p18, p13, p20 y p23, éstas son expresadas por vía RNA subgenómicos que es 3' coterminar (Hilf *et al.*, 1995). La proteína p6 opera como una membrana de anclaje (Satyanarayana *et al.*, 2000); la proteína p65 (un homólogo de la proteína de choque térmico HSP70), p61 y las 2 proteínas de cápside están envueltas en el ensamble del virión (Satyanarayana *et al.*, 2000); p20 se acumula en cuerpos de inclusión amorfos (Gowda *et al.*, 2000); y la p23, una

proteína de unión a RNA (López *et al.*, 2000), controla la acumulación asimétrica de las cadenas positivas y negativas durante la replicación del RNA (Satyanarayana *et al.*, 2002) y está implicada en la expresión de síntomas (Ghorbel *et al.*, 2001, Fagoaga *et al.*, 2005). Las proteínas p23, p20 y p25 actúan como supresores de silenciamiento del RNA (Lu *et al.*, 2004). Las funciones de p33, p13 y p18 siguen sin conocerse.

3. Gen *p23* del CTV

La única proteína de CTV sin homólogo en otros closterovirus es la *p23* (López *et al.*, 2000). En protoplastos de cítricos, su RNA subgenómico (RNAsg) es más abundante al principio de la infección y el segundo con mayor prevalencia en etapas posteriores, sugiriendo un papel para *p23* en etapas tempranas de la replicación o transcripción viral (Hilf *et al.*, 1995; Navas-Castillo *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que la *p23* tiene la habilidad de una proteína de unión a RNA de manera inespecífica en modelos *in vitro*, y las mutaciones afectando los residuos de cisteína e histidina de un dominio de dedo de zinc conservado en diferentes aislamientos, incrementa la disociación constante del complejo *p23*-RNA (López *et al.* 2000). Se atribuye que tiene un papel regulador en la expresión de otros genes del CTV y puede servir como un indicador de la severidad de la enfermedad, esto es muy importante con respecto a encontrar marcadores de diferenciación de aislamientos (López *et al.*, 2000). Además, la *p23* está involucrada en el control de la acumulación asimétrica de las cadenas positivas y negativas durante la replicación del RNA, con un dominio de dedo de zinc y una región básica adyacente siendo indispensable para la acumulación asimétrica de la cadena positiva (Satyanarayana *et al.*, 2000).

La producción de plantas de lima mexicana transgénica expresando constitutivamente el gen *p23* de un aislamiento severo de CTV (T36) muestra alteraciones que asemejan los síntomas inducidos por el CTV en el hospedante, con su intensidad siendo asociada a la acumulación de *p23*. (Ghorbel *et al.*, 2001).

La expresión ectópica del gen *p23* de cepas de tipo débil y severa de CTV en lima mexicana induce aberraciones parecidas a los síntomas virales en hojas, la intensidad de cada una es independiente de la patogenicidad de la cepa de CTV pero se correlaciona con la acumulación de *p23* (Fagoaga *et al.*, 2005). La transformación con *p23* de otros genotipos de cítricos susceptibles y resistentes al CTV (naranja dulce, naranjo agrio, naranjo trifoliado) también produce síntomas parecidos a los del virus que se correlacionan con los niveles de transcritos de *p23*, aunque *p23* es difícilmente detectable en estos hospedantes. En contraste, la expresión transgénica de *p23* en plantas no hospedadoras del CTV como *N. tabacum* y *N. benthamiana* no induce ninguna aberración fenotípica si bien es cierto que lo acumulan consistentemente (Fagoaga *et al.*, 2005). Los resultados sugieren que este gen es un factor muy importante de patogenicidad del CTV que induce alteraciones fenotípicas, interfiriendo en procesos de desarrollo del hospedador (Fagoaga *et al.*, 2005).

Sambade *et al.* (2003) reportó que los polimorfismos localizados en la región de aminoácidos 78-80 de la proteína codificada por el gen *p23* permite la discriminación entre aislamientos débiles y severos. Dieciocho aislamientos de CTV de diferentes orígenes geográficos y características patogénicas fueron clasificados filogenéticamente en 3 grupos: 1.- débil causando aclaramiento de venas, 2.- severo causando picado de tallo y 3.- atípico causando síntomas variables.

En un estudio realizado en Sudáfrica por Stewart A. (2006) con el fin de caracterizar aislamientos que han sido utilizados para protección cruzada e

identificar potenciales candidatos, se encontró que la técnica por RT-PCR bi-direccional desarrollada por Sambade *et al.* (2003) es adecuada para identificar diferencias en los aminoácidos 78-80 del gen *p23*. Este método es dinámico y fácil de establecer, tiene la capacidad de amplificar secuencias de más de un grupo de cepas en una sola PCR; puede ser utilizado para detectar cepas mezcladas en aislamientos también como sus tipos de secuencia. En el mismo estudio fue utilizado el método desarrollado por Hilf y Garnsey (2000) el cual se enfoca en 4 diferentes genotipos (T30, T36, T3 de Florida y VT de Israel). Los cuales muestran diferentes síntomas y tipos de secuencia. Estos aislamientos fueron tratados con el mismo sistema de PCR para comparar los resultados y establecer que método sería el más confiable. Las diferencias en los resultados de los experimentos reflejan niveles de variabilidad (altamente conservado vs. altamente variable) así como los aislamientos que posiblemente contenían cepas mezcladas o recombinantes. Por esto queda la duda de si en realidad los síntomas están directamente relacionados a cepas o aislamientos específicos, o son las interacciones entre cepas, eficiencia de multiplicación, influencia del ambiente y el hospedador etc. más que un indicador del efecto de una cepa en particular en la expresión de los síntomas. El análisis de secuencias de 4 ORFs (Marcos de Lectura Abiertos) del CTV, entre ellos el gen *p23*, muestran que el nivel de divergencia en las secuencias del CTV esta correlacionada con su patogenicidad, teniendo una mayor diversidad los aislamientos severos en comparación con los débiles (Herrera-Isidró *et al.*, 2009).

4. Métodos de discriminación de aislamientos

Se han hecho diversos estudios sobre los genes que conforman el CTV, todos enfocados a minimizar considerablemente el costo, tiempo de detección y la clasificación exacta del aislamiento, todo esto con la finalidad de tener cada día más herramientas que ayuden a entender la relación que hay entre la secuencia del virus y los síntomas que este puede causar.

4.1 Perfiles electroforéticos de conformación de cadena simple (SSCP)

La técnica de perfiles electroforéticos de cadena simple (SSCP, por sus siglas en inglés) es un método capaz de identificar la variación de un sólo nucleótido en un segmento de DNA, típicamente entre 150 a 200 nucleótidos de largo. En condiciones ideales, el rango de sensibilidad del SSCP varía entre 80-90% para detectar mutaciones en fragmentos menores de 200 pares de bases (Sheffield *et al.*, 1993).

El método del SSCP se basa en que bajo condiciones no desnaturalizantes una hebra individual de DNA adopta una conformación espacial que es específica de la composición de su secuencia nucleotídica. Esta conformación sería dependiente de la hibridación entre distintas regiones de un segmento de DNA replegado sobre sí mismo. La configuración diferente es provocada por el cambio de una sola base, entonces podría ser detectada en algunas condiciones de migración electroforética en una matriz de poliacrilamida (Orita *et al.*, 1989, Humphries *et al.*, 1997).

Análisis sobre variaciones en el gen *p25* de la proteína de la cápside han demostrado que es posible identificar y distinguir cepas del CTV por medio de la técnica SSCP (Rubio *et al.*, 1996). Se ha demostrado que el análisis por SSCP es útil para la revisión rápida y el establecimiento de niveles de homogeneidad en una población del CTV. Debido a que los genes *p23* y *p25* dan resultados similares, cualquiera de estas dos regiones puede ser usada para diferenciar aislamientos (Loeza-Kuk *et al.*, 2005). Datos obtenidos en un estudio sobre polimorfismos de una región del gen *p23* del CTV, muestran que el análisis mediante el uso de la técnica SSCP es un procedimiento generalmente confiable para diferenciar variantes en la secuencia del gen *p23* (Sambade *et al.*, 2003).

Cuando se mezclan diferentes concentraciones de RNA de aislamientos del CTV y estos son analizados mediante SSCP, se puede observar que la intensidad de los fragmentos de DNA característicos de una población es proporcional a la concentración de RNA contenida en la muestra. Esta detección es posible cuando una muestra contiene desde el 10% total de la población (Rubio *et al.*, 2000). El cambio de hospedadores usualmente induce cambios en el RNA genómico de las poblaciones, como fue mostrado por Rubio *et al.* (2000) al transferir el virus del CTV de una planta de toronja a naranja dulce y nuevamente a toronja, observando que el patrón de fragmentos de DNA del gen p20 en un análisis por SSCP, puede cambiar dependiendo del hospedador y que al regresar al hospedador original, este vuelve a su forma original, en otras plantas el cambio fue permanente. Esto ayuda a explicar un poco la diversidad biológica observada en los diferentes aislamientos del CTV.

4.2 Métodos basados en PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) fue descrita por primera vez en 1985 por Kary B. Mullis. Es una técnica utilizada en biología molecular para amplificar secciones de DNA usando 2 secuencias de DNA cortas (iniciadores) que flanquean el inicio y el final de una secuencia.

La diferencia en las secuencias del gen *p25* que codifica para la proteína de la cápside del CTV permitió el desarrollo de una PCR bi-direccional para diferenciar cepas como también para detectar infecciones mezcladas de CTV (Cevik *et al.*, 1996). Se ha comprobado la efectividad de esta técnica para la discriminación de aislamientos de CTV en el estado de Nuevo León (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2010).

Sambade *et al.* (2003) demostró que las diferencias de aminoácidos en las posiciones 78-80 codificados por el gen *p23* de CTV, pueden ser explotadas para diseñar iniciadores para la detección específica de secuencias

características de 3 grupos de aislamientos (severo, débil y atípico) por RT-PCR bi-direccional.

El método de RT-PCR bi-direccional, dirigido al gen p25 de la cápside, posee una mayor sensibilidad en comparación con las técnicas ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) y DTBIA (*direct tissue blot immunoassay*) para detección de aislamientos del CTV que causan declinamiento y aquellos que no lo causan (Huang *et al.*, 2004).

Ruiz-Ruiz *et al.* (2009) utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real, con un set de iniciadores general, para diferenciar entre cepas del CTV severas que causan picado de tallo, severas causando amarillamiento (*seedling yellows*) y cepas débiles. Su método permite la detección e identificación de aislamientos al realizar cuatro reacciones independientes. Yokomi *et al.* (2010) por otra parte desarrolló un método de RT-PCR múltiple en tiempo real, mediante sondas dirigidas a secuencias ubicadas entre las proteínas de la cápside mayor (p25) y menor (p27), para identificar cepas severas del CTV y separar los genotipos que reaccionan con el anticuerpo monoclonal MCA13.

4.3 Serología

Se han desarrollado varios métodos con bases serológicas y moleculares como un esfuerzo para diferenciar aislamientos de CTV (Niblett *et al.*, 2000). Estos métodos incluyen el uso del anticuerpo monoclonal MCA13 de raza discriminatoria (Permar *et al.*, 1990) y sondas serológicas para la detección de aislamientos de CTV del tipo picado de tallo (Nikolaeva *et al.*, 1998) entre otros.

Silva-Vara *et al.* (2001) llevó a cabo un estudio para determinar la ocurrencia del virus de la tristeza (CTV) en plantaciones comerciales de cítricos en el estado de Nuevo León, México. La detección se realizó mediante la prueba de ELISA utilizando anticuerpos policlonales anti-CTV, y mediante el

anticuerpo monoclonal MCA13 de reacción específica. Se obtuvo una reacción positiva al anticuerpo monoclonal MCA13 de reacción específica en 35 de los 47 aislamientos del CTV detectados. En un muestreo 2 veces al año de 1996 a 1998 se encontró un incremento en la ocurrencia del CTV de 0.27 y 0.18%, en las plantaciones de Montemorelos y Linares, respectivamente. No se detectaron árboles adicionales infectados por el CTV en la huerta de Hualahuises, tampoco se encontró ningún síntoma asociado al CTV en el estado de Nuevo León.

En el sur de Florida se ha caracterizado el gen p25 de aislamientos del virus tristeza por medio de sondas moleculares, específicas para aislamientos con diferentes niveles de severidad, y ELISA, encontrando que mediante estos métodos no es posible tener una idea exacta del tipo de síntomas que pueden causar los aislamientos analizados (Halbert *et al.*, 2004).

Iracheta-Cárdenas *et al.* (2002) produjo la proteína recombinante del gen p25 a partir de 2 aislamientos del CTV de México, y se realizaron comparaciones de las secuencias con otros de diferentes partes del mundo, los resultados indican la presencia potencial de aislamientos del virus de la tristeza del tipo picado de tallo en forma asintomática. Además, se han descubierto aislamientos del tipo severo en el estado de Nuevo León mediante el uso del anticuerpo monoclonal MCA13, RT-PCR bi-direccional e hibridación con sondas específicas, todo esto dirigido al gen p25 de la cápside (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2010).

Cabe la posibilidad de que en las huertas de cítricos del estado de Nuevo León existan cepas del CTV con la capacidad de inducir síntomas severos. Esta sospecha está fundamentada en el análisis del gen p25 del CTV únicamente. Por lo tanto, es necesario el análisis molecular de diferentes genes del virus que posean características únicas como las del gen p23. Es por esto que en el presente trabajo se explorará la caracterización molecular de aislamientos del estado de Nuevo León con base al gen p23 del virus.

HIPÓTESIS

Es posible discriminar aislamientos del CTV del estado de Nuevo León mediante análisis de SSCP y PCR bi-direccional para el gen *p23*.

JUSTIFICACIÓN

El virus de la tristeza ocurre en forma natural en las plantaciones de cítricos en forma de mezclas de aislamientos o razas en una misma planta. Los diferentes aislamientos del virus difieren en sus propiedades biológicas de severidad en diversos hospedantes cítricos. En México se ha determinado la presencia del CTV en plantaciones comerciales de cítricos en 20 estados de la República. La ausencia de síntomas de decaimiento por el CTV a nivel de campo ha propiciado una interpretación inexacta de la fitosanidad de las plantaciones, con la premisa de que los aislamientos presentes son débiles y que por consecuencia inocuos a la citricultura. Este es uno de los motivos por los cuales el gobierno federal suspendió a partir del año 2007 la ministración de recursos económicos para la aplicación de la campaña de monitoreo a nivel nacional (Norma 031). Existen trabajos donde por métodos moleculares se puede determinar la severidad de los aislamientos del CTV, éstos basados en el gen *p25* de la proteína de la cápside del virus. En el presente trabajo se explorará la caracterización molecular de aislamientos del estado de Nuevo León con base al gen *p23* del virus.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar molecularmente el gen *p23* del virus tristeza de los cítricos con fines de discriminación de aislamientos del estado de Nuevo León.

Objetivos Específicos

- 1.- Implementar las técnicas de perfiles electroforéticos de ácidos nucleicos de cadena simple (SSCP) y PCR bi-direccional para el gen *p23* del virus tristeza de los cítricos.
- 2.- Evaluar las técnicas de SSCP y PCR bi-direccional para el gen *p23* del virus tristeza de los cítricos para la discriminación de aislamientos del estado de Nuevo León.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de tejido de plantas de cítricos infectadas por el CTV

Se utilizaron 20 muestras de tejido de plantas de cítricos infectadas por el CTV (Tabla 1). Nueve muestras correspondieron a aislamientos del CTV del estado de Nuevo León, de los municipios de Montemorelos, Linares y General Terán; siete muestras de California y dos de Florida de los Estados Unidos de Norteamérica. Las muestras se emplearon como tejido desecado o tejido fresco según su origen.

Tabla 1. Aislamientos del virus tristeza de los cítricos del estado de Nuevo León, México y de los estados de Florida y California, Estados Unidos de Norteamérica.

Muestra No.	Clave de identificación	Origen
1	4038 L-5 A14	Linares (Nuevo León, México)
2	GT A2	General Terán (Nuevo León, México)
3	GT 11 SUR	General Terán (Nuevo León, México)
4	GT A27	General Terán (Nuevo León, México)
5	GT A272	General Terán (Nuevo León, México)
6	GT A30	General Terán (Nuevo León, México)
7	T166 L3 A4	Montemorelos (Nuevo León, México)
8	T166 L21 A6	Montemorelos (Nuevo León, México)
9	T166 L47 A16	Montemorelos (Nuevo León, México)
10	SY568 3448	California (EEUU)
11	SY568 5095	California (EEUU)
12	SY568 5066	California (EEUU)
13	CCTEA 5067	California (EEUU)
14	CCTEA 466 5072	California (EEUU)
15	CCTEA 457 5069	California (EEUU)
16	CCTEA 442	California (EEUU)
17	T66	Florida (EEUU)
18	T36	Florida (EEUU)

2. Extracción de ácidos nucleicos de RNA viral

El RNA total de cada muestra se extrajo usando el sistema de aislamiento RNA Total SV de Promega (Cat. Z3100) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Antes del tratamiento, las muestras se pulverizaron en presencia de nitrógeno líquido para después almacenarlas a -25°C.

3. Obtención de DNA complementario del gen *p23*

3.1 Diseño de iniciadores

Se diseñaron 2 iniciadores específicos para el gen *p23* (Tabla 2), basados en secuencias de los aislamientos T36 (U16304), VT (U56902), T385 (Y18420), y T30 (EU937520), alojadas en la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en Inglés). Para ello se hizo uso de las herramientas informáticas Clustalw (Goujon *et al.*, 2010), Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000) y CAP3 (Huang y Madan, 1999).

Tabla 2. Secuencia de iniciadores empleados en las reacciones de transcripción reversa y PCR para la amplificación del gen *p23* del virus tristeza de los cítricos.

Iniciador	Polaridad	Secuencia Nucleotídica	Sitio de Unión
p231	+	ATGGATAATACTAGCGGACA	18390–18410
p232	-	TCAGATGAAGTGGTGTTCG	19003–19020

3.2 Retro-transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa

El DNA complementario (DNAC) se sintetizó con el protocolo RT-PCR simple usando RNA como plantilla y los iniciadores p231 y p232 (Tabla 2), específicos para el gen *p23* que están basados en secuencias conservadas de aislamientos del CTV. La RT-PCR se realizó con el kit AccessQuick RT-PCR System (Promega) en una reacción con 50 μ L conteniendo: 25 μ L AccesQuick Master mix 2x, 1 μ L de cada Iniciador, 12 μ L de H₂O y 5 μ L de RNA. La reacción se condujo en un termociclador con las condiciones siguientes: 30 min a 45°C para RT, 2 min a 94°C, 30 ciclos de 50 s a 94°C 50 s a 55°C y 50 s a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C.

3.3 Estandarización de condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa

Para la obtención de condiciones óptimas de amplificación de secuencias del gen *p23*, se realizó un gradiente de temperatura de alineamiento desde 50°C hasta 60°C, cantidad de MgCl₂ desde 1 μ M hasta 3 μ M, y una concentración de iniciadores desde 0.1 μ M hasta 0.6 μ M, con la finalidad de obtener un producto de amplificación de calidad con un mayor número de copias del gen *p23*.

4. Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP)

Para el análisis SSCP, 1 μ L del producto de PCR de cada muestra se mezcló con 9 μ L de solución desnaturizante (95% formamida, 20mM EDTA pH 8.0, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% xileno-cyanol), se calentó por 10 min a 99°C e inmediatamente se enfrió. Las cadenas de DNA se separaron por electroforesis en una cámara SE 250 Mighty Small II (Hoefer) 8x7 cm en un gel de poliacrilamida no desnaturizante (8%), usando TBE (89mM Tris-borato, pH 8.0, 2mM EDTA) como buffer de electroforesis, y un voltaje constante de 200 v

por 3 hrs 45 min a 4°C (Rubio *et al.*, 1996). Para la visualización de los perfiles electroforéticos de los ácidos nucleicos se utilizó la modificación del método de tinción con nitrato de plata por Benbouza *et al.* (2006). El análisis de patrones electroforéticos se realizó con el programa Fingerprint II de Bio-Rad.

5. RT-PCR Bi-direccional

La presencia de cada uno de los 3 tipos de aislados fue detectada por medio de RT-PCR bi-direccional, con el método de Cevik *et al.* (1996), usando 2 iniciadores externos (p231 y p232) (Tabla 2) y 2 iniciadores internos de polaridad opuesta (PM82 y PM83, ó PM82 y PM84) (Tabla 3, Figura 1). Los iniciadores p231 y p232 fueron diseñados de la secuencia de 2 regiones de *p23* conservadas en la mayoría de los aislamientos de CTV, mientras que los iniciadores PM82, PM83 y PM84 estuvieron basados en una región interna la cual su secuencia permite la clasificación de aislamientos de CTV en 3 grupos diferentes (Sambade *et al.*, 2003).

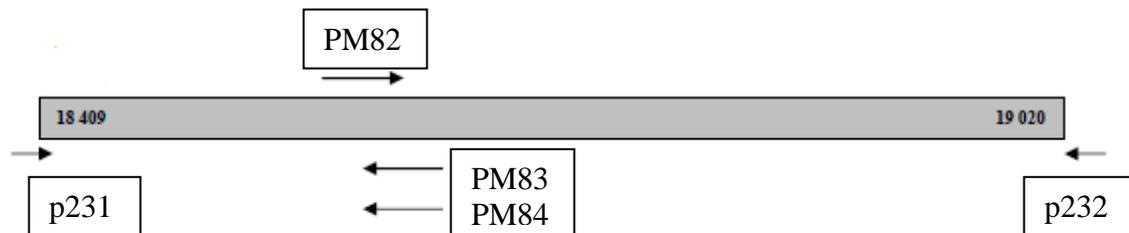


Figura 1. Representación esquemática del gen *p23* con el juego de iniciadores para la reacción de PCR bi-direccional, p231, p232, PM82, PM83, PM84 (Sambade *et al.*, 2003).

La amplificación con iniciadores p231, p232, PM82 y PM83 (Reacción A) permite la detección de secuencias características de cepas débiles (productos de 630 y 254 pb), severas (productos de 630 y 411 pb), o ambos grupos (productos de 630, 411 y 254 pb). Por otra parte la amplificación con iniciadores

p231, p232, PM82 y PM84 (Reacción B) permite la detección de secuencias características de cepas severas (productos de 630 y 411 pb), atípicas (productos de 630 y 254 pb), ó ambos grupos (productos de 630, 254 y 411 pb). El termociclador se programó para sintetizar la primera cadena de DNAc a 45°C por 30 min. Para amplificación: 94°C por 1 min, para desnaturalización; 52°C por 2 min, para alineamiento de iniciadores; 72°C por 1 min, elongación por 40 ciclos, seguido de 1 ciclo de desnaturalización por 1 min y luego elongación extendida a 72°C por 10 min. Finalmente se corrieron las muestras en gel de agarosa al 2% tiñéndolas con SYBR green (Bio-rad), para después fotografiarlas.

Tabla 3. Secuencia de iniciadores empleados en las reacciones de PCR bi-direccional para el gen *p23*.

Iniciador	Polaridad	Secuencia Nucleotídica	Sitio de Unión
PM82	+	AAACACGATAAGGCATCGAG	18544–18563
PM83	-	CACTTACGTTTCAGTCTTGAGCG	18588–18609
PM84	-	CATTTACGTTTCGGTCTTCAAC	18627–18647

Fuente: Sambade *et al.* (2003)

RESULTADOS

1. Obtención de DNA complementario para el gen *p23*

Los iniciadores p231 y p232 para el gen *p23* fueron usados como primer paso para amplificar secuencias conservadas en diferentes aislamientos del CTV, en la Figura 2 se ilustran los productos de amplificación de 630 pb para un número determinado del total de muestras analizadas. Todas las muestras seleccionadas para caracterización produjeron el fragmento de DNA esperado de 630 pb (datos no mostrados). En ambas PCR bi-direccional se utilizaron los siguientes aislamientos del CTV como controles: T36 (atípica), T66 (severa).

Las condiciones óptimas para amplificación de fragmentos de DNA con los iniciadores p231 y p232 fueron: 55°C para temperatura de alineamiento de iniciadores, 2 µM de concentración final de MgCl₂ y 0.02 µM de concentración final de Iniciadores.

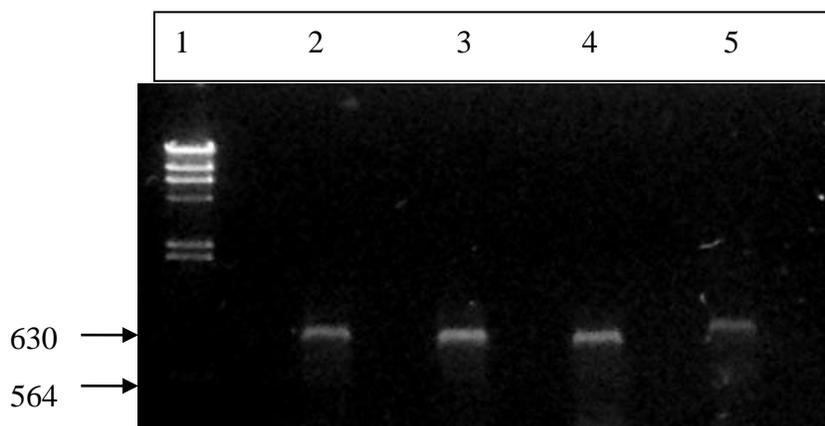


Figura 2. Productos de amplificación en gel de agarosa 2% del gen *p23* de aislamientos del CTV usando los iniciadores p231 y p232. El producto de amplificación esperado es 630 pb. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular, 2.- CCTEA 442 (California), 3.- CCTEA 5067 (California), 4.- CCTEA 466 (California), 5.- SY568 5066 (California). En las 18 muestras se observó la misma amplificación de 630 pb.

2. SSCP Polimorfismo de conformación de cadena simple

La técnica de SSCP se realizó conforme al método de Rubio *et al.* (1996). Cada producto de PCR fue desnaturalizado e inmediatamente enfriado para obtener la conformación característica de cada muestra.

En la Figura 3 se ilustran los perfiles electroforéticos obtenidos por SSCP para las 18 muestras analizadas. Se obtuvieron diversos perfiles en cuanto a número de fragmentos amplificados, que osciló de 2 a 17, así como en los patrones de migración de los mismos. Con base en el número de fragmentos amplificados y los patrones de migración, las 18 muestras se acomodaron en 4 grupos. El grupo 1 formado por CCTEA 442, SY568 5095, CCTEA 457 5069, CCTEA 5067 con 6 fragmentos; Grupo 2 formado por T36, T166 L21 A6, GT A30, GT A27 y T66 con 3 fragmentos. Grupo 3 formado por GT A2 y T166 L47 A16 con 3 fragmentos. Grupo 4 formado por CCTEA 466 5072 y SY568 5066 con 5 fragmentos. Los aislamientos SY568 3448, T166 L21 A6, A272, GT11 SUR y T166 L3 A4 formaron un grupo heterogéneo entre sí en los patrones de migración y número de fragmentos amplificados (Figura 3), y no se pudieron ubicar en los grupos anteriores.

En la Figura 4 se ilustra el dendrograma obtenido con el software Fingerprint II (Bio-rad) mediante el método UPGMA (Unweighted pair-group method) utilizando el coeficiente de Dice. Las 18 muestras analizadas se acomodaron en 3 grandes grupos con un porcentaje de similitud entre fragmentos del 40%, solamente los aislamientos SY568 3448, T166 L21 A6 y T166 L3 A4 quedaron excluidos de los grupos, la división muestra una diferencia significativa entre las muestras de California y las de Nuevo León.

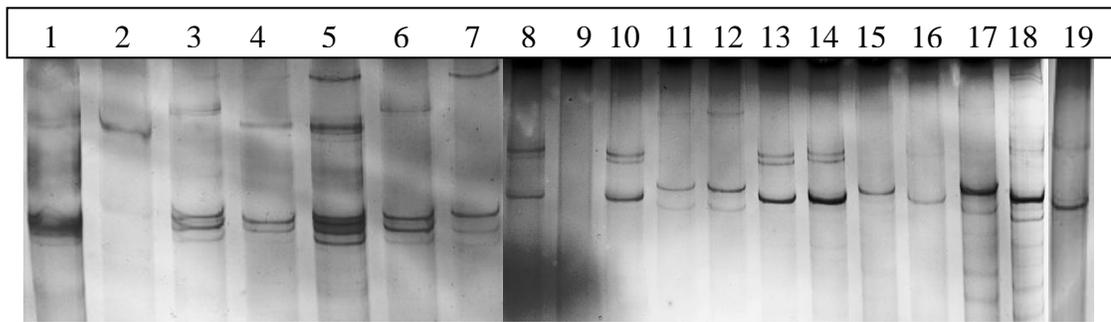


Figura 3. Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP). Electroforesis en gel de poliacrilamida 8% 200v por 3 hrs 45 min. De la reacción de PCR del gen *p23* de las 18 muestras tratadas. Número de fragmentos de DNA por carril: 1.- CCTEA 442 (California) 10; 2.- SY568 3448 (California) 3; 3.- SY568 5095 (California) 7; 4.- CCTEA 457 5069 (California) 6; 5.- CCTEA 5067 (California) 9; 6.- CCTEA 466 5072 (California) 5; 7.- SY568 5066 (California) 4; 8.- T36 (Florida) 3; 9.- Solución desnaturizante; 10.- 4038 L5 A14 (Montemorelos) 3; 11.- GT A2 (General Terán) 4; 12.- T166 L47 A16 (Montemorelos) 4; 13.- GT A30 (General Terán) 3; 14.- GT A27 (General Terán) 4; 15.- T166 L21 A6 (Montemorelos) 2; 16.- GT A272 (General Terán) 2; 17.- GT11 SUR (General Terán) 6; 18.- T166 L3 A4 (Montemorelos) 17; 19.- T66 (Florida) 3.

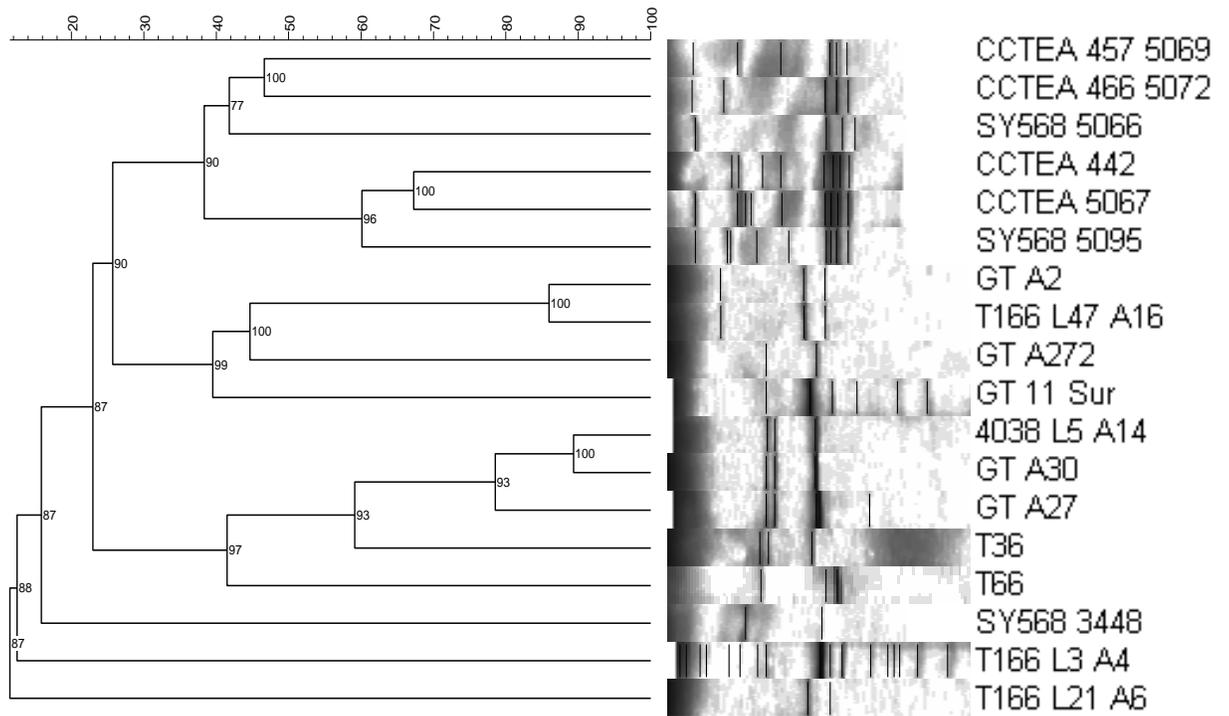


Figura 4. Dendrograma obtenido con el software Fingerprint II (Bio-rad) mediante el método UPGMA (*Unweighted pair-group method*) utilizando el coeficiente de Dice.

3. RT-PCR Bi-direccional

Los resultados obtenidos con las 18 muestras procesadas utilizando los iniciadores p231, p232, PM82 y PM83 para diferenciar aislamientos severos y débiles (Reacción A) generaron (Figura 5, Tabla 4): Fragmentos de 630 pb para las muestras T166 L3 A4 (Montemorelos) , T36 (Florida) y T66 (Florida). Fragmentos de 411 pb para las muestras CCTEA 442 (California), SY568 3448 (California), SY568 5095 (California), CCTEA 457 5069 (California), CCTEA 5067 (California), SY568 5066 (California) y T36 (Florida), y fragmentos de 254 pb para las muestras 4038 L5 A14 (Linares), GT A2 (General Terán), T166 L47 A16 (Montemorelos), GT A30 (General Terán), GT A27 (General Terán), GT A272 (General Terán), GT11 Sur (General Terán), T166 L3 A4 (Montemorelos), T36 (Florida). Las muestras que no mostraron amplificación fueron CCTEA 466 5072 (California), T166 L21 A6 (Montemorelos) y control sano (Figura 5).

Por otra parte, utilizando los iniciadores p231, p232, PM82 y PM84 para diferenciar aislamientos severos y atípicos (Reacción B) generaron (Figura 6, Tabla 4): Fragmentos de 630 pb para SY568 5066 (California), 4038 L5 A14 (Linares), GT A2 (Montemorelos), T166 L3 A4 (Montemorelos), T36 (Florida). Fragmentos de 411 pb para CCTEA 442 (California), SY568 5095 (California), CCTEA 457 5069 (California), CCTEA 5067 (California), GT A30 (General Terán) y T66 (California); y fragmentos de 254 pb para CCTEA 442 (California), SY568 5095 (California), CCTEA 457 5096 (California), CCTEA 5067 (California), CCTEA 466 5072 (California), GT A2 (General Terán), GT A30 (General Terán), T166 L3 A4 (Montemorelos), T36 (Florida). Muestras sin amplificación SY568 3448 (California), T166 L47 A16 (Montemorelos), T166 L21 A6 (Montemorelos), GT A272 (General Terán) y control sano (Figura 6).

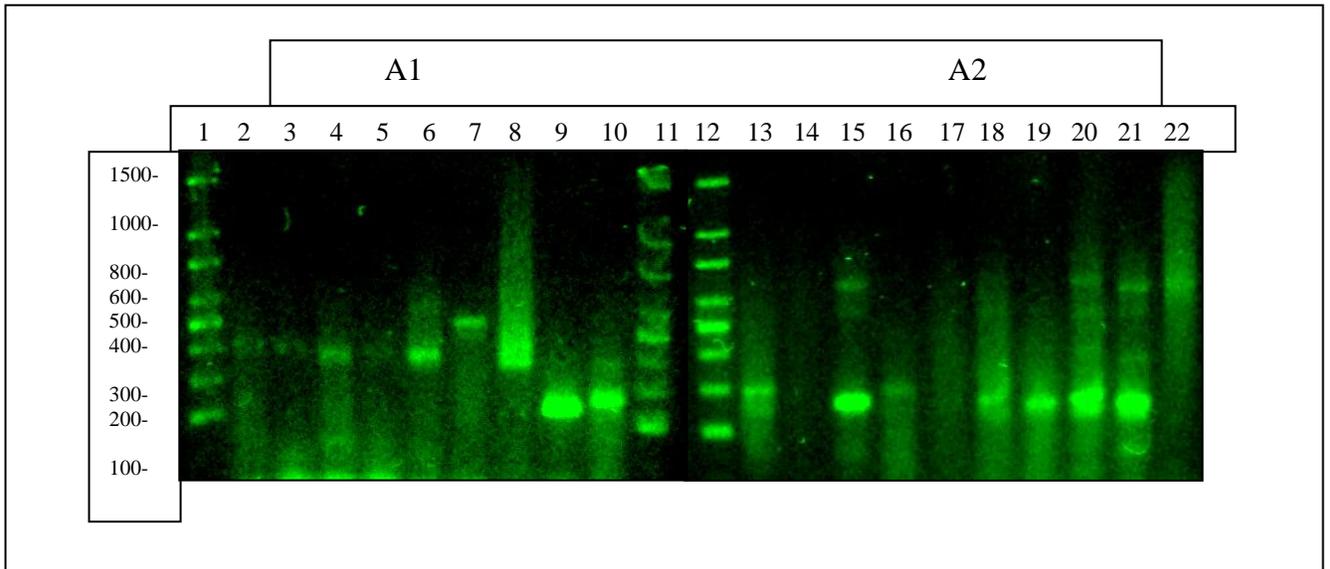


Figura 5. Productos de amplificación en gel de agarosa 2% de la reacción de RT-PCR bi-direccional del gen *p23* de las 18 muestras de CTV usando los iniciadores p231, p232, PM 82, y 83 (Reacción A) para distinguir entre cepas severas y débiles. Los tamaños de amplificación posibles son 630 pb, 411 pb, 254 pb. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular; 2.- CCTEA 442 (California), 3.- SY568 3448 (California), 4.- SY568 5095 (California), 5.- CCTEA 457 (California), 6.- CCTEA 5067 (California), 7.- CCTEA 466 (California), 8.- SY568 5066 (California), 9.- 4038 L5 A14 (Linares), 10.- GT A2 (General Terán), 11.- Marcador de peso Molecular, 12.- Marcador de peso Molecular, 13.- T166 L47 A16 (Montemorelos), 14.- Control sano, 15.- GT A30 (General Terán), 16.- GT A27 (General Terán), 17.- T166 L21 A6 (Montemorelos), 18.- GT A272 (General Terán), 19.- GT11 Sur (General Terán), 20.- T166 L3 A4 (Montemorelos), 21.- T36 (Florida), 22.- T66 (Florida).

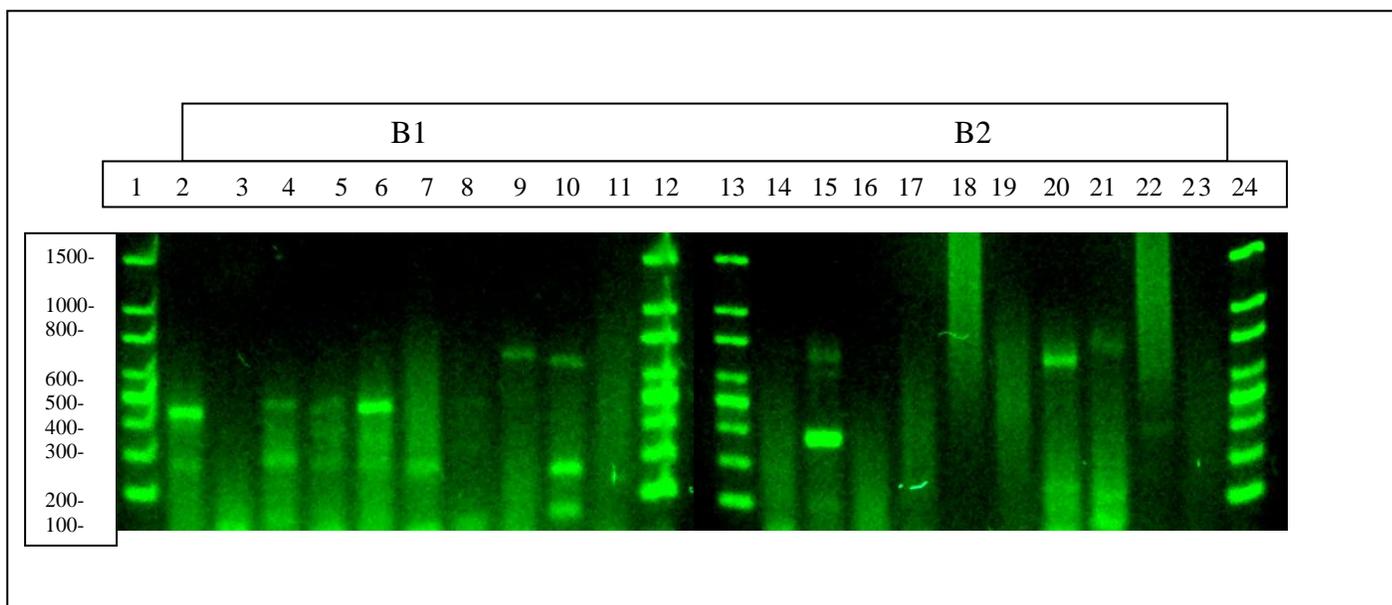


Figura 6. Productos de amplificación en gel de agarosa 2% de la reacción de RT-PCR bi-direccional del gen *p23* para las 18 muestras de CTV usando los iniciadores p231, p232, PM 82 y 84 (Reacción B) para distinguir entre cepas severas y atípicas. Los tamaños de amplificación posibles son 630 pb, 411 pb, 254 pb. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular; 2.- CCTEA 442 (California), 3.- SY568 3448 (California), 4.- SY568 5095 (California), 5.- CCTEA 457 (California), 6.- CCTEA 5067 (California), 7.- CCTEA 466 (California), 8.- SY568 5066 (California), 9.- 4038 L5 A14 (Linares), 10.- GT A2 (General Terán), 11.- Control sano, 12.- Marcador de peso Molecular, 13.- Marcador de peso molecular, 14.- T166 L47 A16 (Montemorelos), 15.- GT A30 (General Terán), 16.- A27 (General Terán), 17.- T166 L21 A6 (Montemorelos), 18.- GT A272 (General Terán), 19.- GT11 Sur (General Terán), 20.- T166 L3 A4 (Montemorelos), 21.- T36 (Florida), 22.- T66 (Florida), 23.- Control sano, 24.- Marcador de peso molecular.

Tabla 4. Representación gráfica de los productos amplificados por RT-PCR bi-direccional para cada aislamiento, usando los iniciadores p231, p232, PM82, PM83 (severo y débil); e iniciadores p231, p232, PM82 y PM84 (severo y atípico).

No	Muestra	Fragmento amplificado (pb)						*Interpretación
		Iniciadores 82-83 (A)			Iniciadores 82-84 (B)			
		411	254	630	411	254	630	
1	4038 L5 A14 (Linares)	-	+	-	-	-	+	D
2	GT A2 (General Terán)	-	+	-	-	+	+	D/A
3	GT11 Sur (General Terán)	-	+	-	-	-	-	D
4	GT A27 (General Terán)	-	+	-	-	-	-	D
5	GT A272 (General Terán)	-	+	-	-	-	-	D
6	GT A30 (General Terán)	-	+	-	+	-	-	S/D
7	T166 L3 A4 (Montemorelos)	-	+	+	-	+	+	D/A
8	T166 L21 A6 (Montemorelos)	-	-	-	-	-	-	N
9	T166 L47 A16 (Montemorelos)	-	+	-	-	-	-	D
10	SY568 3448 (California)	+	-	-	-	-	-	S
11	SY568 5095 (California)	+	-	-	+	+	-	S/A
12	SY568 5066 (California)	+	-	-	+	-	-	S/A
13	CCTEA 5067 (California)	+	-	-	+	+	-	S
14	CCTEA 466 (California)	-	-	-	-	+	-	A
15	CCTEA 457 (California)	+	-	-	+	+	-	S/A
16	CCTEA 442 (California)	+	-	-	+	+	-	S/A
17	T66 (Florida)	-	-	+	+	-	-	S
18	T36 (Florida)	+	+	+	-	+	+	S/D/A
19	Control sano	-	-	-	-	-	-	N

* (+) Amplificación

* (-) No amplificación

* (S) Severo; (D) Débil; (A) Atípico; (N) No definido

DISCUSIÓN

El análisis SSCP es una herramienta simple y efectiva para detectar mutaciones mínimas en fragmentos de DNA sin la necesidad de secuenciar (Rubio *et al.*, 1996). Es un procedimiento sencillo para comparar la composición de 2 aislamientos del CTV para el gen analizado y ver si el mayor componente de las poblaciones es el mismo en ambos lados.

Los patrones electroforéticos del DNA en las muestras 4038 L5 A14, GT A2, GT A30, GT A27, T36 y T66 mostraron 3 fragmentos en vez de solo 2, esto puede ser debido a la presencia de 2 conformaciones estables para una de las cadenas (Rubio *et al.*, 1996). La presencia de múltiples fragmentos de DNA en un perfil electroforético usualmente indica que el DNA analizado contiene más de una variante de secuencia. Previamente fue observado que el perfil de SSCP del gen p20 refleja la composición de la población de RNA, y que las variantes de secuencia pueden ser detectadas con al menos 10% de la población de RNA (Rubio *et al.*, 2000).

Los perfiles electroforéticos de las muestras analizadas de Nuevo León y las correspondientes de California y Florida mostraron un número de fragmentos de DNA que osciló de 2 a 17 (Figura 3). Se considera que cada banda corresponde a una cadena del DNA dúplex, lo que indica que existe una combinación de hasta 8 haplotipos en los aislamientos. Las muestras de California en su mayoría poseen 3 o más haplotipos (CCTEA 442, SY568 5095, CCTEA 457 5069, CCTEA 5067), 3 muestras poseen solo 2 (SY568 5095, CCTEA 466 5072 y SY568 5066). La mayoría de las muestras de Nuevo León poseen menos de 3 haplotipos (4038 L5 A14, GT A2, T166 L47 A16, GT A130, GT A27, T166 L21 A6, y GT A272), solo 2 muestras poseen 3 o más (GT11 SUR y T166 L3 A4). En un análisis previo de la estructura poblacional de un grupo limitado de aislamientos del CTV, la homocigosidad del gen p18 fue

mayor en aislamientos débiles que en aislamientos severos (Ayllón *et al.*, 1999). Se ha observado que aislamientos débiles generalmente contienen un solo tipo de secuencia, mientras que la mayoría de los severos contienen 2 o 3 tipos de secuencias (Ayllón *et al.*, 2001). Los resultados muestran una clara relación entre el número de fragmentos de DNA observados en el análisis SSCP y su patogenicidad, teniendo los aislamientos severos (según la clasificación obtenida por PCR bi-direccional, Figura 5 y 6) un mayor número de fragmentos comparado con los débiles.

Sambade *et al.* (2002) realizó un análisis SSCP de los genes p18 y p20, en los cuales inoculó plantas con aislamientos débiles y severos. Al inocular un aislamiento severo en una planta pre-inoculada con uno débil observó que el aislamiento débil fue desplazado por el severo al cabo de 3-6 meses, la detección del aislamiento severo en plantas sanas fue de 6 semanas después de la inoculación en comparación de 10-14 semanas en plantas pre-inoculadas con un aislamiento débil. La aparición de síntomas de plantas sanas infectadas con aislamientos severos se observa al cabo de 1 año de la inoculación, no se menciona el dato del tiempo que tarda en mostrar síntomas en una protección cruzada. Esto supone que la muestra con el aislamiento GT A30 contiene poblaciones severas y débiles pero es posible que la población severa aún no predomine por completo, aún así su presencia pudo ser comprobada mediante la técnica de PCR bi-direccional.

El mismo caso ocurre con las muestras de Nuevo León GT A2 y T166 L3 A4 que pertenecen al grupo atípico, los síntomas que podrían mostrar son variables y esto debe ser tomado en cuenta ya que existe la posibilidad que en el futuro desarrollen síntomas de picado de tallo y amarillamiento. Posiblemente la banda de DNA con mayor intensidad en la técnica de SSCP pertenezca a la secuencia débil, en las muestras GT A30, GT A2 y T166 L3 A4 se pudieron observar fragmentos de DNA con muy baja intensidad es probable que esos

fragmentos posean características de un aislamiento severo y atípico en sus secuencias.

Se observó una separación clara entre los aislamientos de California y los de Nuevo León, siendo los de California en su mayoría severos con excepción de la muestra CCTEA 466 que aún perteneciendo al grupo atípico posee una secuencia con el potencial de causar síntomas similares a los de un aislamiento severo.

Debido al número de fragmentos de DNA observados, se comprobó la existencia de mezclas de aislamientos en las muestras: CCTEA 442, SY568 5095, CCTEA 457 5069, CCTEA 5067, CCTEA 466 5072, GT11 SUR y T166 L3 A4 (Figura 3).

Cuando los perfiles electroforéticos se analizaron mediante el método de pares sin peso (UPGMA) utilizando el coeficiente de Dice (Figura 4), las 18 muestras analizadas se acomodaron en 3 grandes grupos con un porcentaje de similitud entre fragmentos del 40%, solamente los aislamientos SY568 3448, T166 L21 A6 y T166 L3 A4 quedaron excluidos de los grupos, la división muestra una diferencia significativa entre las muestras de California y las de Nuevo León.

Con la técnica de SSCP fue posible detectar mezclas de aislamientos con facilidad, pero no fue posible discriminar aislamientos con los patrones electroforéticos obtenidos.

En cuanto al procedimiento de PCR bi-direccional, este puede ser utilizado para ensayos rápidos y a gran escala. El análisis de muestras de campo con PCR bi-direccional puede detectar e identificar aislamientos del CTV aún cuando este se encuentre en muy bajas concentraciones. Además puede

ser utilizado para la detección de mezclas de virus en una misma planta (Cevik *et al.*, 1996).

La técnica de PCR bi-direccional mostró que aislamientos con diferencias simples en los nucleótidos de una región reducida en el gen *p23* pueden ser detectadas en este sistema desarrollado por Sambade *et al.* (2003). Algunos aislamientos muestran fragmentos de DNA con poca intensidad lo que dificulta el análisis. No se realizó clonación de la secuencia predominante como lo hizo Sambade *et al.* (2003) ya que esto podría no ser práctico para análisis rutinarios, además que es importante detectar cualquier variante de secuencia no solo las predominantes.

Aún cuando la PCR pudiera contribuir a seleccionar la secuencia predominante, este hecho no puede garantizarse así, o al menos de manera determinante o absoluta. Como en todas las reacciones de PCR es común tener un cierto rasgo de parcialidad, y esto debido a aspectos inherentes en la técnica, en este caso podría ser debido a una predominancia de cierta cepa/variante debido a una interacción más estable de su secuencia con los iniciadores y el templado, sin asociación con la cepa predominante. Una interacción más estable iniciador/templado pudiera estar basada en la termodinámica, complementariedad o la presencia de estructuras secundarias. Estos parámetros que pueden ser responsables de variantes en los resultados de la reacción quedan por ser vistos.

Los aislamientos fueron categorizados en sus respectivos grupos en base a este sistema de PCR. Las designaciones de grupos de aislamientos fueron hechas por las reacciones de PCR bi-direccional A y B descritas anteriormente. En la mayoría de las muestras no se observa la amplificación de la banda de 630 pb, esto puede ser debido a que la reacción se inclina preferencialmente a la producción de fragmentos de 411 y 254 pb, o por que los iniciadores *p231* y *p232* no se alinean con tanta facilidad como los iniciadores

internos PM 82,83 y 84. Ambas posibilidades llevan a la amplificación de la cadena más corta y al término de componentes de la reacción (Stewart, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos con la PCR bi-direccional las muestras de California CCTEA 442, SY568 3448, SY568 5095, CCTEA 457, CCTEA 5067 y SY568 5066 mostraron amplificación del fragmento de 411 pb (Tabla 4), lo cual se interpreta como reacción de severidad. Solo la muestra CCTEA 466 no mostro amplificación del fragmento de 411 pb característica de los aislamientos severos. Las muestras CCTEA 442, SY568 5095, CCTEA 457, CCTEA 5067, CCTEA 466 mostraron amplificación del fragmento de 254 pb (Tabla 4, Reacción B), que se interpreta como reacción de aislamiento atípico. SY568 3448 y SY568 5066 no mostraron amplificación del fragmento de 254 pb para la reacción de aislamiento atípico. Los aislamientos de Nuevo León 4038 L5 A14, GT A2, T166 L47 A16, GT A30, GT A27, GT A272, GT11 Sur, T166 L3 A4, mostraron amplificación del fragmento de 254 pb (Tabla 4, Reacción A) característica de un aislamiento débil. La muestra GT A30 mostró además de el fragmento de 254 pb (Tabla 4, Reacción A) un fragmento de 411 pb (Tabla 4, Reacción B) característico de un aislamiento severo. Las muestras GT A2 y T166 L3 A4 mostraron además del fragmento de 254 pb de un aislamiento débil (Tabla 4, Reacción A) un fragmento de 254 pb (Tabla 4, Reacción B) característico de un aislamiento atípico. Los aislamientos de Florida T36 y T66 mostraron amplificación del fragmento de 411 pb (Tabla 4) característico de aislamientos severos, la muestra T36 además del fragmento de 411 pb, mostró amplificación de los fragmentos de 254 pb en ambas reacciones (Tabla 4, Reacción A y B), lo que significa que también pertenece a los grupos débil y atípico.

Con los resultados obtenidos se puede deducir que las muestras de California CCTEA 442, SY568 5095, CCTEA 457 y CCTEA 5067 poseen una mezcla de poblaciones característica de aislamientos severos y atípicos. Las muestras SY568 3448 y SY568 5066 solo poseen poblaciones del grupo severo

y la muestra CCTEA 466 solo contiene poblaciones características de aislamientos atípicos.

Por otra parte, los aislamientos de Nuevo León 4038 L5 A14 (Linares), T166 L47 A16 (Montemorelos), GT A27 (General Terán), GT A272 (General Terán) y GT11 Sur (General Terán) solo poseen secuencias características de cepas del tipo débil. Los aislamientos GT A2 (General Terán) y T166 L3 A4 (Montemorelos) poseen una mezcla de poblaciones del tipo débil y atípico, mientras que el aislamiento GT A30 (General Terán) posee una mezcla de poblaciones del tipo severo y débil.

Las muestras de Florida T36 y T66 pertenecen al grupo severo, con excepción de T36 que además del grupo severo mostró una mezcla de secuencias características del tipo débil y atípico. La razón por la que la muestra T36 mostró pertenecer a más de un tipo de cepa, en comparación a los estudios realizados por Sambade *et al*, (2003) y Stewart (2006) que mostró solamente amplificación del fragmento de 254 pb característico de una cepa atípica, puede ser debido a que en este estudio no se realizó clonación de la secuencia predominante en las muestras por lo que existe la posibilidad de que en la planta infectada con T36 existan poblaciones con secuencias características de cepas débiles y severas.

La muestra T166 L21 A6 no mostró amplificación con ningún iniciador, es probable que la secuencia del aislamiento no tenga la capacidad de alinearse con ninguno de los iniciadores internos PM82, PM83 ó PM84.

Las muestras T166 L3 A4 y GT A2 mostraron amplificación del fragmento de 254 pb característico de aislamientos débiles (Reacción A, Tabla 4) y 254 pb característico de aislamientos atípicos (Tabla 4, Reacción B), aún cuando estos resultados no indican que las muestras poseen una secuencia característica de

un aislamiento severo, queda la posibilidad de que puedan inducir picado de tallo o amarillamiento en el hospedador, de acuerdo con Sambade *et al.*, (2003).

La clasificación de aislamientos en los grupos débil, severo y atípico está basada solamente en la diferencia de nucleótidos de un área específica del gen *p23*, la cual es explotada por los iniciadores internos PM 82, 83 y 84. Por lo tanto la amplificación de la cadena de 630 pb con los iniciadores p231 y p232 no es necesaria para la diferenciación de aislamientos, pero sí como soporte en la reacción de PCR bi-direccional.

Las diferencias en los nucleótidos situados en las regiones de los iniciadores P82, PM83 y PM84 fueron explotadas para diseñar iniciadores que detectaran secuencias características de los 3 grupos de aislamientos por PCR bi-direccional. Los aislamientos débiles analizados por Sambade *et al.* (2003) contenían solamente la secuencia típica de ese grupo, mientras que la mayoría de los aislamientos severos contenían la secuencia característica de su grupo, y adicionalmente, secuencias características del grupo débil y/o del grupo atípico, indicando que los síntomas severos están asociados con los tipos de secuencia severa y/o atípica. Con este método es posible discriminar entre: 1.- aislamientos del tipo severo y atípico que causan amarillamiento o picado de tallo, y 2.- aislamientos débiles que no causan amarillamiento o picado de tallo.

Los resultados de un estudio sobre el gen *p25* del CTV indican la presencia potencial de aislamientos del virus de la tristeza del tipo picado de tallo en forma asintomática en México (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2010). En la actualidad no se han detectado síntomas de declinamiento en cítricos del estado de Nuevo León aún cuando se tiene la presencia del virus en ciertas plantaciones.

Con los resultados obtenidos se puede suponer que la razón de la ausencia de síntomas en Nuevo León es debido a que solo existen virus con secuencias características de aislamientos débiles, lo que se demuestra con los resultados de la técnica de PCR bi-direccional. Solamente la muestra GT A30 de Nuevo León produjo amplificación de 411 pb (Tabla 4, Reacción B) y 254 (Tabla 4, Reacción A) característica de una mezcla de aislamientos del tipo severo y débil.

La muestra T166 L3 A4 del estado de Nuevo León ha sido caracterizada anteriormente mediante hibridación con sondas de DNA para el gen p25 de la cápside y el anticuerpo monoclonal MCA13 (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2010), los resultados indican que este aislamiento pertenece al grupo severo además del débil. En el presente estudio se obtuvieron resultados que agrupan a la muestra T166 L3 A4 como un aislamiento del tipo débil únicamente, al no haber obtenido amplificación de los fragmentos de 411 pb para aislamientos severos (Reacción A y B) ni 254 pb para aislamientos atípicos (Reacción B) en la reacción de PCR bi-direccional (Figura 5 y 6). La razón de la diferencia en los resultados puede ser debido a eventos de recombinación. Se han realizado investigaciones extensivas sobre recombinación del CTV (Ayllón *et al.*, 1999, Mawassi *et al.*, 1995, Rubio *et al.*, 2001). Se ha propuesto que la recombinación homóloga y no-homóloga podría ser un fenómeno frecuente en el CTV y virus de RNA; la recombinación ha evolucionado como una forma de regenerar genomas funcionales de otros con mutaciones dañinas acumuladas como resultado de la actividad de corrección de RNA polimerasas RNA-dependientes (García-Arenal *et al.*, 2001). La mayor función de recombinación en el CTV (el cual tiene un genoma extenso) puede ser para actuar como un mecanismo compensatorio para equilibrar la acumulación de mutaciones dañinas. Un beneficio adicional de recombinación podría ser una diversidad genética aumentada y adaptabilidad (Rubio *et al.*, 2001).

Para análisis rutinarios de aislamientos del CTV basados en el gen *p23* podría ser suficiente usar este sistema de PCR bidireccional ya que la secuenciación y análisis filogenéticos son más complicados y costosos. Aún así el gen *p23* solo representa una pequeña porción del genoma completo y por lo tanto este sistema debe ser usado en conjunto con otros métodos que se enfoquen en otras regiones del genoma para tener una imagen más amplia del tipo de secuencia del aislamiento antes de dar una respuesta definitiva del tipo de aislamiento que se tiene.

CONCLUSIONES

1. Las diferencias en los perfiles electroforéticos del gen *p23* del CTV obtenidos mediante la técnica SSCP no permitieron la discriminación de aislamientos del estado de Nuevo León, México.
2. La técnica SSCP es una herramienta útil para detectar mezclas de poblaciones del CTV del estado de Nuevo León, México.
3. Es posible detectar secuencias del gen *p23* del CTV características de cepas débiles, severas y atípicas mediante la técnica de RT-PCR bi-direccional.
4. Los aislamientos del CTV; GT A2, GT A30 y T166 L3 A4 del estado de Nuevo León, México; poseen secuencias en el gen *p23* que los identifica como severos.

LITERATURA CITADA

- Ayllón MA, López C, Navas-Castillo J, Garnsey SM, Guerri J, Flores R, Moreno P. 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of the Citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of the three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology* 146: 27-40.
- Ayllón MA, López C, Navas-Castillo J, Mawassi M, Dawson WO, Guerri J, Flores R, Moreno P. 1999. New defective RNAs from Citrus tristeza virus: evidence for a replicase-driven template switching mechanism in their generation. *J Gen Virol* 80: 817–821.
- Bar-Joseph M, Marcus RM, Lee R. 1989. The continuous challenge of Citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27:292-316.
- Beidler LL, Hilliard PR, Rill RL. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical Biochemistry* 126: 374–380.
- Benbouza G, Jacquemin JM, Baudoin JP, Mergeai G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2), 77-81.
- Cevik B, Pappu SS, Pappu HR, Benscher D, Irely M, Lee RF, Niblett C.L. 1996. Application of bi-directional PCR to Citrus tristeza virus: Detection and strain differentiation. In: Da Graca JV, Moreno P, Yokomi RK (eds.), *Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, Riverside, CA, pp 17–24.
- Fagoaga C, López C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L. 2005. Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus-specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 435–445.
- FAO. 2005. <http://faostat.fao.org>.
- García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Reviews. Phytopathology* 39: 157-186.
- Ghorbel R, López C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L. 2001. Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology* 2, 27–36.

- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic acids research* 2010 Jul, 38 Suppl: W695-9.
- Gowda S, Satyanarayana T, Davis CL, Navas-Castillo J, Albiach-Martí MR, Mawassi M, Valkov N, Bar-Joseph M, Moreno P, Dawson WO. 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274, 246–254.
- Halbert SE, Genc H, Cevik B, Brown LG, Rosales IM, Manjunath KL, Pomerinke M, Davison DA, Lee RF, Niblett CL. 2004. Distribution and characterization of *Citrus tristeza virus* in south Florida following establishment of *Toxoptera citricida*. *Plant Dis.* 88:935-941.
- Herrera-Isidrón L, Ochoa-Sánchez JC, Rivera-Bustamante R, Martínez-Soriano J. 2009. Sequence diversity on four ORFs of *Citrus tristeza virus* correlates with pathogenicity. *Virology Journal* 6:116.
- Hilf ME, Karasev AV, Pappu HR, Gumpf DJ, Niblett CL, Garnsey SM. 1995. Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208:576-582.
- Hilf ME, Garsney SM. 2000. Characterization and classification of *Citrus tristeza virus* isolates by amplification of multiple molecular markers. Fourteenth Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, CA, pp 18-27.
- Huang X, Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9, 868-877.
- Huang Z, Rundell PA, Guan X, Powell CA. 2004. Detection and isolate differentiation of *Citrus tristeza virus* in infected field trees based on reverse transcription–polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 88:625-629.
- Humphries S, Gudnadson V, Whittall R, Day I. 1997. Single strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry* 43: 427-435.
- Iracheta-Cárdenas MM, Almeyda IH, Manjunath K, Cevik Bayram, Niblett C, Lee R, Rocha-Peña MA. 2002. Molecular Cloning and expression of the p25 gene of two Mexican isolates of *Citrus tristeza virus*. *Revista de Fitopatología.* 20:174-181.
- Iracheta-Cárdenas MM, Almeyda IH, Cevik B, Niblett, Lee RF, Rocha MA. 2010. Serological and Molecular Tools for strain discrimination of *Citrus tristeza virus* Isolates from Nuevo León, México. *Agrociencia* 44: 449-460.

- Loeza-Kuk, E. 2003. Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del *Citrus tristeza closterovirus*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México. 85 p.
- Loeza-Kuk E, Palacios EC, Ochoa D, Mora G, Gutiérrez MA, Febres VJ, Moore GA, Álvarez R. 2005. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from Veracruz and Tamaulipas states, México. 407-41 1p. In: Proc. 16th Conf. IOCV. International organization of Citrus Virologists, Riverside, CA.
- López C, Navas-Castillo J, Gowda S, Moreno P, Flores R. 2000. The 23 kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* 269:462-470.
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li WX, Falk BW, Dawson WO, Ding SW. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101, 15742–15747.
- Mawassi M, Karasev A, Mietkiewska E, Gafny R, Lee RF, Dawson WO, Bar-Joseph M. 1995. Defective RNA molecules associated with *Citrus tristeza virus*. *Virology* 208, 383-387.
- Mooney P, Richardson A. 1992. Seasonal trends in the uptake and distribution of nitrogen in satsuma mandarins. *International Citrus Congress (7th: 1992: Acireale, Italy), Acireale, Italy, International Society of Citriculture. 2: 593-597.*
- Mooney P, Harty A. 1992. HortResearch Publication - Citrus Tristeza Virus. <http://www.hortnet.co.nz/publications/science/kk0894.htm> [Consulta: 10 Octubre 2012].
- Navas-Castillo J, Albiach-Marti MR, Gowda S, Hilf ME, Garnsey SM, Dawson WO. 1997. Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology* 228:92-97.
- Niblett CL, Genc H, Cevik B, Halbert S, Brown L, Nolasco G, Bonacalza G, Manjunath KL, Febres VJ, Pappu HR, Lee RF. 2000. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of the citrus tristeza disease. *Virus Research* 71: 91-106.
- Nikolaeva OV, Karasev AV, Garnsey SM, Lee RF. 1998. Serological differentiation of the *Citrus tristeza virus* isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Dis.* 82: 1276-1280.

- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86:2766-2270.
- Pappu SS, Febres VV, Pappu HR, Lee RF, Niblett CL. 1997. Characterization of the 3' proximal gene of the Citrus tristeza Closterovirus genome. *Virus Research* 47: 51-57.
- Permar TA, Garnsey SM, Gumpf DJ, Lee RF. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80: 224-228.
- Rocha-Peña, M.A. 2009. El virus tristeza de los cítricos en México: Hechos y Perspectivas. *Revista Conocimiento (Nuevo León)* 96:70-73.
- Rocha-Peña, M.A., RF. Lee, R. Lastra, C. L. Niblett, F. M. Ochoa-Corona, S. M. Garnsey, R. K. Yokomi. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in Caribbean and Central and North América. *Plant Disease* 79: 437-445.
- Rocha-Peña, MA, y Padrón-Chávez, J.E. (ed.). 2009. El cultivo de los cítricos en el estado de Nuevo León. Libro Científico Num. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. CIRNE. Campo Experimental General Terán. México. 467p.
- Rocha-Peña MA, y Silva-Vara S. 1994. Detección del virus de la tristeza de los cítricos en viveros del estado de Veracruz/1992-1993. Informe de labores. INIFAP/SAGAR. Campo Experimental General Terán. General Terán, N.L. México.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Rubio L, Ayllón MA, Guerri J, Pappu HR, Niblett CL, Moreno P. 1996. Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Annals of Applied Biology* 129: 479-489.
- Rubio L, Guerri J, Moreno P. 2000. Characterization of *Citrus Tristeza Virus* Isolates by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of DNA Complementary to Their RNA Population. Fourteenth IOCV Conference, 2000-*Citrus Tristeza Virus*.
- SAGARPA. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos. Secretaría de

- Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 15 p.
- SAGARPA. 2007. Avances del Programa Nacional de Reconversión Productiva de la Cadena Citrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 24 p.
- SAGARPA. 2011. Ficha Técnica CTV Virus tristeza de los cítricos. <<http://www.senasica.gob.mx/>> [Consulta: 15 Octubre 2012].
- Sambade A, Rubio L, Garnsey SM, Costa N, Muller GW, Peyrou M, Guerri J, Moreno P. 2002. Comparison of the viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*. Application to monitoring cross protection. *Plant Pathology* 51: 257–265.
- Sambade A, López C, Rubio L, Flores R, Guerri J, Moreno P. 2003. Polymorphism of a specific region on gene p23 of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Archives of Virology* 148: 2325-2340.
- Satyanarayana T, Gowda S, Mawassi M, Albiach-Marti MR, Ayllón MA, Robertson C, Garnsy SM, Dawson WO. 2000. Closterovirus encoded Hsp70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virión assembly. *Virology*, 278: 253-265.
- Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA, Albiach-Marti MR, Dawson WO. 2002. Mutational analysis of the replication signals in the 3' nontranslated region of *Citrus tristeza virus*. *Virology* 300, 140-152.
- Sheffield V, Beck J, Kwitek A, Sandstrom D, Stone E. 1993. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitutions. *Genomics*. (16): 325-332.
- Silva-Vara S, Peña del Rio MA, Peña-Martínez R, Villegas-Jiménez N, Byerly-Murphy KF, Rocha-Peña MA. 2001. Distribution of citrus tristeza virus in three comercial groves in Nuevo León, México. *Agrociencia* 35:441-450.
- Stewart KA. 2006. Sudáfrica. Characterization and strain differentiation of the p23 gene of South African CTV isolates using a bi-directional RT-PCR system and Phylogenetic analysis. Presentada en la Facultad de Ciencias Naturales y Agrícolas de la Universidad de Pretoria para la obtención del grado de Maestría en Ciencias en Microbiología.
- Wallace J.M. 1978. Virus and viruslike diseases. In: *The Citrus Industry, Volume IV*. Pp: 67- 184. W. Reuther EC, Calavan and G.E. Carman (eds.). University of California, Division of Agriculture Sciences, California, USA. 362 p.

Yokomi RK, Lastra R, Stoetzel MB, Damsteegt VD, Lee RF, Garnsey SM, Gottwald TR, Rocha-Peña MA, Niblett CN. 1994. Establishment of the brown citrus aphid *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean basin and its transmission of Citrus Tristeza Virus. *Journal of Economic Entomology* 87:1078-1085.